

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)
25 March 1999 (25.03.99)

International application No.
PCT/JP98/02993

Applicant's or agent's file reference
D3-906PCT

International filing date (day/month/year)
02 July 1998 (02.07.98)

Priority date (day/month/year)
20 August 1997 (20.08.97)

Applicant

YOKOI, Haruhiko et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
04 March 1999 (04.03.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Sean Taylor

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

13T
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

> 0 0 0

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference D3-906PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP98/02993	International filing date (day/month/year) 02 July 1998 (02.07.98)	Priority date (day/month/year) 20 August 1997 (20.08.97)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/85, 5/10, A61K 48/00		
Applicant DNAVEC RESEARCH INC.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>4</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 04 March 1999 (04.03.99)	Date of completion of this report 15 November 1999 (15.11.1999)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP98/02993

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages 1-14,16-17,19-22,25-28, as originally filed
pages 15,18,23-24, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages 1-13, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
pages 1-4, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the sequence listing part of the description:
pages 1/1-11/11, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP98/02993

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-13	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-13	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-13	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Claims 1 through 13

The inventions relating to claims 1 through 13 are not described in any of the documents cited in the ISR, nor are they obvious to a person skilled in the art.

特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'D 26 NOV 1999

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 D3-906PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP98/02993	国際出願日 (日.月.年) 02.07.98	優先日 (日.月.年) 20.08.97
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁶ C12N15/85, C12N5/10, A61K48/00		
出願人 (氏名又は名称) 株式会社ディナベック研究所		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>3</u> ページからなる。 <input checked="" type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で <u>4</u> ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 04.03.99	国際予備審査報告を作成した日 15.11.99	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 引地 進 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 9549

1. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書 第 1-14, 16-17, 19-22, 25-28 ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 15, 18, 23-24 ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 請求の範囲 第 1-13 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 図面 第 1-4 ~~ページ~~図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 明細書の配列表の部分 第 1/11-11/11 ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲 1-13 有
請求の範囲 無

進歩性(IS)

請求の範囲 1-13 有
請求の範囲 無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲 1-13 有
請求の範囲 無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲 1-13
請求の範囲 1-13に係る発明は、国際調査報告で提示された何れの文献にも記載されておらず、当業者にとって自明なものでもない。

oc.Natl. Acad. Sci. USA、93巻、1320-24頁；鐘ヶ江ら、バイオマニュアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法、1994、43-58頁、羊土社）に従った。以下に具体的な実施例を記す。

アデノウィルス（Ad）5型ゲノムのほぼ全長からE1及びE3領域を除く31kbのAdDNAを持つ42KbのコスミドpAdex1cw（鐘ヶ江ら、1994、細胞工学、13巻、8号、757-763頁）を、SwaIで切断し、ゲル濾過にて脱塩した。また、「p53RECre」または「p53RELZ」をPmeIで切断し、p53依存のCreまたはLacZ遺伝子発現ユニットを含む切断産物（各々2.9、5.3kb）を単離した。両者をT4リガーゼによる連結反応に供した後、酵素を熱失活し、ゲル濾過にて脱塩し、SwaIによる切断反応を行った。切断産物はフェノールによる酵素失活処理後脱塩し、再びSwaIで切断した。その一部についてギガバックXLキット（ストラタジーン社、米国）によるインビトロ・パッケージングを行い、連結産物を大腸菌に導入した。得られたアンピシリン耐性形質転換株のいくつかについてコスミドを調製し、制限酵素消化によりその構造を調べ、p53依存発現ユニットが目的の方向（E1A、E1Bの転写と逆方向）に挿入された組換えコスミドを単離した。それらを「pAxp53RECre」、または「pAxp53RELZ」と名づけた。

一方、E1及びE3領域を欠くアデノウィルス5型（Ad5 d1X株）のDNA-末端蛋白質複合体（DNA-TPC）を斎藤らの方法（鐘ヶ江ら、1994、バイオマニュアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法、43-58頁、羊土社）により調製した。これを制限酵素EcoT22Iで消化し、ついでゲル濾過により脱塩処理した。

「pAxp53RECre」（または「pAxp53RELZ」）とEcoT22I消化Ad5 d1XDNA-TPCを混合し、セルフェクトキット（ファルマシア社、スウェーデン）を用いて、293細胞に導入した。翌日、トランスフェクションした293細胞を懸濁し、その懸濁液、および10倍ないし100倍希釈液（293細胞懸濁液にて希釈）を96穴プレートにまいた。約2週間後に、293細胞内での組換えによって生じた組換えアデノウィルスの増殖が見られたウェルから、死滅細胞を含む培養液を取り出した。それを数回凍

転写終結領域 (0.2kb) を増幅し、単離した。該断片を制限酵素SacIおよびSacIIで切断後、pBluescriptII SK(-)のSacI-SacII部位間にクローニングした。挿入配列の塩基配列を決定し、変異のないクローンを選択した。このプラスミドを「pBS-pA3」と名づけた。

3-3) loxP配列の合成とクローニング (図3)

loxP配列と制限酵素EcoRI、SmaI、NotIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチドL1F (AATTCATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATCCCGGGGC : 配列番号19) およびL1R (GGCCGCCCCGGGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATG : 配列番号20) をT4ポリヌクレオチドキナーゼで処理し、5'末端にリン酸基を付与した。その後両者をアニールさせた後、pBS-CMVのEcoRI-NotI部位間にクローニングした。挿入配列の塩基配列を決定し、配列の過ちのないクローンを選択した。このプラスミドを「pBS-CMVL」と名づけた。

また、loxP配列と制限酵素NotI、SalI、SpeI、Sse8387Iの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチドL2F (GGCCGCGTCGACATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATACTAGTCCTGCA : 配列番号21) およびL2R (GGACTAGTATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGTCGACGC : 配列番号22) を同様にT4ポリヌクレオチドキナーゼで処理し、アニールさせた後、「pBS-PA3」のSse8387I-NotI部位間にクローニングした。挿入配列の塩基配列を決定し、配列の過ちのないクローンを選択した。このプラスミドを「pBS-LpA3」と名づけた。

3-4) レポーター構築用プラスミドベクターの作製 (図3)

「pBS-CMVL」を制限酵素Asp718およびNotIで切断し、CMVプロモーター部分およびloxP配列を含む0.9kbの断片を単離した。また、「pBS-LpA3」をAsp718およびNotIで切断し、loxP配列、SV40ウィルス後期遺伝子転写終結領域、およびプラスミドの複製開始領域と選択マーカを含む3.2kbの断片を単離した。両断片が連結されたプラスミドを単離し、「pBS-CLLA」と名づけた。このプラスミドはCMVエンハンサー／プロモーター／SV40イントロン領域-2つのloxP-SV40ウィルス後期遺伝子

・コレクション) をウェル当たり 4×10^5 細胞播種した6穴プレートに対し、「AxYp53RELZ」、および「AxCAYp53」を標記のMOI (multiplicity of infection) で感染させた。感染方法は、鐘ヶ江らの方法 (バイオマニュアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法、1994、43-58頁、羊土社) に従った。3日後に感染細胞の粗抽出液を調製し、ガラクトンプラスキット (トロピクス社、米国) を用いて、 β ガラクトシダーゼ活性を測定した。表1にその結果を示す。

表 1

No	細胞	AxCAYp53 (MOD)	AxYp53RELZ (MOI)	β ガラクトシダーゼ (RLU/ μ g)
1	Saos2 (p53-)	0	0	0
2		0	100	12
3		10	0	0
4		10	100	284611
5	Hs68 (p53+)	0	0	0
6		0	100	347741
7		10	0	0
8		10	100	452385

このプロモーターはp53により強力に誘導されること、また、p53陽性細胞の場合、内在性p53のみでp53依存プロモーターが十分に誘導されることが示された。

2) p53依存の発現抑制；評価系1

CMVプロモーター-loxP-LacZ遺伝子-loxP-転写終結シグナルからなるユニットが細胞のゲノムに挿入されたp53欠損細胞「A8a」、「AxCAYp53」、および「AxYp53 RECre」を用いて、p53依存のLacZ発現の抑制を検討した。前日にA8aをウェル当たり 4×10^5 細胞播種した6穴プレートに対し、各種組換えアデノウィルスで標記のMOIで感染させた。7日後に感染細胞の粗抽出液を調製し、1)と同様に β ガラクトシダーゼ活性を測定した。表2に相対活性で表したその結果を示す。

表 2

No	細胞	AxCAYp53 (MOI)	AxYp53RECre (MOI)	β ガラクトシダーゼ (ratio)
1	A8a	0	0	1
2		0	100	0.91
3	A8a	30	0	1
4		30	100	0.17

この細胞では、p53-のときには「AxYp53RECre」による発現抑制は見られないが、p53を発現させた場合には「AxYp53RECre」による発現抑制が観察された。

3) p53依存の発現抑制；評価系2

CMVプロモーター-loxP-LacZ遺伝子（またはルシフェラーゼ遺伝子）-loxP-転写終結シグナルからなるユニットを含む組換えアデノウィルス（「AxYCMLLZ」、または「AxYCMLluc」）、「AxCAYp53」、および「AxYp53RECre」を用いて、p53依存のLacZ発現の抑制を検討した。前日にSaos2をウェル当たり 4×10^5 細胞播種した6穴プレートに対し、「AxCAYp53」および「AxYp53RECre」を標記のMOIで感染させた。その翌日、「AxYCMLLZ」、または「AxYCMLluc」を感染させた。その5日後に感染細胞の粗抽出液を調製し、1)と同様に β ガラクトシダーゼ活性、またはプロメガ社製アッセイシステムによりルシフェラーゼ活性を測定した。表3および4に相対活性で表したその結果を示す。

表 3

No	細胞	AxYCMLLZ (MOI)	AxCAYp53 (MOI)	AxYp53RECre (MOI)	β ガラクトシダーゼ (ratio)
1	Saos2	10	0	0	1
2		10	0	100	1.47
3	Saos2	10	10	0	1
4		10	10	100	0.09

特 許 協 力 条 約

EP US PCT 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 D3-906PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P98/02993	国際出願日 (日.月.年) 02.07.98	優先日 (日.月.年) 20.08.97
出願人(氏名又は名称) 株式会社ディナベック研究所		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

2. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

3. ☒ この国際出願は、ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。

☒ この国際出願と共に提出されたもの

☐ 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの

☐ しかし、出願時の国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない

☐ この国際調査機関が書換えたもの

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/02993

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁸ C12N15/85, C12N5/10, A61K48/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁸ C12N15/85, C12N5/10, A61K48/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), Genbank/EMBL/DDBJ/Geneseq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 97/12970, A1 (CANCER RESEARCH CAMPAIGN TECHNOLOGY LIMITED) 10.4月.1997 (10.04.97) & GB, 2305920, A & AU, 9671386, A	1-13
A	Nigei, J. et al. "Site-specific recombinases: tools for genome engineering" Trends Genet. (1993) 第9巻 第12号 p. 413-421	1-13
A	Ta-Jen, L. et al. "Apoptosis Induction Mediated by Wild-Type p53 Adenoviral Gene Transfer in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck" Cancer Res. (1995) 第55巻 第14号 p. 3117-3122	1-13
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	14.09.98	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 富士 良宏 電話番号 03-3581-1101 内線 3449



(51) 国際特許分類6 C12N 15/85, 5/10, A61K 48/00	A1	(11) 国際公開番号 WO99/09191 (43) 国際公開日 1999年2月25日 (25.02.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/02993 (22) 国際出願日 1998年7月2日 (02.07.98) (30) 優先権データ 特願平9/223651 1997年8月20日 (20.08.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ディナベック研究所 (DNAVEC RESEARCH INC.) [JP/JP] 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 Ibaraki, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 横井治彦 (YOKOI, Haruhiko) [JP/JP] 武田勝男 (TAKEDA, Katsuo) [JP/JP] 長谷川護 (HASEGAWA, Mamoru) [JP/JP] 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社 ディナベック研究所内 Ibaraki, (JP) (74) 代理人 弁理士 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)	(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title: VECTORS FOR TREATING CANCER (54) 発明の名称 癌治療用ベクター (57) Abstract A technique for gene expression specific to cells free from a specific transcription factor, which comprises constructing a recombinase expression unit wherein a recombinase gene is located in the downstream of a promoter depending on the specific transcription factor and another unit wherein two target sequences of a desired gene to be expressed and the recombinase are located in the downstream of another promoter; and infecting cells with these units. According to this technique, in cells carrying the specific transcription factor, the recombinase is expressed and thus recombination occurs between the recognition sequences, whereby the target gene is not expressed but deleted. In cells free from the specific transcription factor, on the other hand, the recombinase is not expressed and thus no recombination occurs between the recognition sequences, which allows the expression of the target gene.		

特定の転写因子に依存するプロモーターの下流に組み換え酵素遺伝子を配置した組み換え酵素の発現ユニットと、他のプロモーターの下流に発現させるべき所望の遺伝子と組み換え酵素の2つの標的配列を配置したユニットとを作製し、これらユニットを細胞に感染させることにより、特定の転写因子が存在する細胞では組み換え酵素が発現し認識配列間の組換えが起こるため目的遺伝子が欠失して遺伝子の発現が起こらないが、特定の転写因子が存在しない細胞では組み換え酵素が発現せず認識配列間の組換えが起こらないため目的遺伝子の発現が引き起こされるという、特定の転写因子が存在しない細胞に特異的な遺伝子発現技術を見いだした。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL アルバニア
AM アルメニア
AT オーストリア
AU オーストラリア
AZ アゼルバイジャン
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルキナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ
CG コンゴ
CH スイス
CI コートジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CU キューバ
CY キプロス
CZ チェッコ
DE ドイツ
DK デンマーク
EE エストニア
ES スペイン

FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB 英国
GD グレナダ
GE グルジア
GH ガーナ
GM ガンビア
GN ギニア
GW ギニア・ビサウ
GR ギリシャ
HR クロアチア
HU ハンガリー
ID インドネシア
IE アイルランド
IL イスラエル
IN インド
IS アイスランド
IT イタリア
JP 日本
KE ケニア
KG キルギスタン
KP 北朝鮮
KR 韓国
KZ カザフスタン
LC セントルシア
LI リヒテンシュタイン

LK スリ・ランカ
LR リベリア
LS レソト
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MC モナコ
MD モルドヴァ
MG マダガスカル
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア
共和国
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
MX メキシコ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノルウェー
NZ ニュージーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア
SD スーダン
SE スウェーデン
SG シンガポール

SI スロヴェニア
SK スロヴァキア
SL シエラ・レオネ
SN セネガル
SZ スワジランド
TD チャード
TG トーゴ
TJ タジキスタン
TM トルクメニスタン
TR トルコ
TT トリニダード・トバゴ
UA ウクライナ
UG ウガンダ
US 米国
UZ ウズベキスタン
VN ヴェトナム
YU ユーゴスラビア
ZW ジンバブエ

明細書

癌治療用ベクター

技術分野

本発明は、特定の転写因子が存在しない細胞に特異的に遺伝子を発現させる技術及びその癌治療への応用に関し、遺伝子治療などの分野に属する。

背景技術

癌とは、体細胞の変異あるいはウィルス感染等により細胞増殖の制御メカニズムが変調し、その結果細胞が無秩序に増殖し、さらに周辺の組織へ浸入・占領することで個体を死にいたらしめる疾病である。細胞の増殖は、それを促進する方向に働く遺伝子と、それを抑制する遺伝子の働きのバランスにより制御される。癌細胞では多くの場合、遺伝子の変化、即ち前者の遺伝子（原癌遺伝子とも呼ばれる、例えばras、myc、ablなど）が変異などを受けて異常に活性が高まるか、あるいは後者の遺伝子（癌抑制遺伝子とも呼ばれる、例えば、Rb、p53、APCなど）が変異やウィルス遺伝子の作用などにより不活化されるかして、増殖制御のメカニズムが変化している。これら癌関連遺伝子のうち、特にp53とよばれる癌抑制遺伝子は、これまで調べられた癌細胞の約半数で変異を受けていることが明らかになっており、p53の機能失活と発癌との関連性が非常に注目されている（Levineら、1997、Cell、88巻、323-331頁）。

ところで近年のDNA分子の運搬物（ベクター）の開発が進むにつれ、遺伝子治療が現実のものとなり、その最も大きなターゲットとして癌への応用が研究されている。その戦略は大きく、①サイトカイン遺伝子を導入して癌細胞に対する免疫能を高める方法、②抗癌剤の感受性が高い骨髄細胞にMDRのような保護遺伝子を導入して感受性を下げ、より強力な化学療法を可能にする方法、③癌細胞を自殺に

導く遺伝子を導入する方法、などに分けられる (Davisら、1996、Curr.Opin.Oncol., 8巻、499-508頁)。このうち特に③の戦略では、選択性、即ち癌細胞では高い殺細胞効果を与えるが正常細胞への毒性がほとんどないことが望まれる。そのため、癌細胞に特異的に (自殺) 遺伝子を発現させる方法の開発が行われている。

癌細胞に特異的な遺伝子発現系の代表的なものとしては、正常細胞に比べて癌細胞で発現の高い遺伝子のプロモーターを利用する方法が知られている。例えば、肝臓の多くで高発現を示すAFP (α -fetoprotein) 遺伝子のプロモーター (玉置ら、1995、蛋白質核酸酵素、40巻、17号、2613-2617頁)、メラノーマの多くで高発現を示すチロシナーゼ遺伝子のプロモーター (Vileら、1993、Cancer Res., 53巻、3860-64頁)、乳癌と膵臓癌の多くで高発現を示すerbB2遺伝子のプロモーター (Harrisら、1994、Gene Ther., 1巻、170-175頁)、前立腺癌の多くで高発現を示すPSA (prostate specific antigen) 遺伝子のプロモーター (Pangら、1995、Hum. Gene Ther., 6巻、1417-26頁) などが対応する癌の種類に特異的な遺伝子発現を与えることが示されている。しかしながら、これらのプロモーターはごく一部の癌にのみ適用可能であり、また全ての癌でこのようなプロモーターが同定されているわけではない。さらに、これらのプロモーターによる遺伝子発現では絶対的な発現量は必ずしも高くない。

また、多くの癌でその機能異常が認められているp53を癌に特異的な遺伝子発現系に応用する試みもなされている。例えば、最近公開されたBalmainらのシステムがあげられる (Balmainら、WO97/12970)。このシステムは、目的遺伝子を発現させるプロモーターとして「癌細胞 (あるいはp53の機能がない細胞) で発現が高まる」プロモーター (例えばhsp70遺伝子のプロモーター) を用いることと、目的遺伝子の発現を「down-regulation」する遺伝子 (配列特異的転写サプレッサー、リボザイム、アンチセンス遺伝子) をp53依存プロモーターの支配下に発現させる第2のユニットを用いることを特徴としている。これら2つのユニットを細胞に導入したとき、正常細胞では目的遺伝子の発現を支配するプロモーターの活性が弱く、

さらにp53依存にサプレッサー（またはアンチセンス、リボザイム）が発現するので目的遺伝子の発現がこれによっても抑制される。これに対して癌細胞では、目的遺伝子の発現を支配するプロモーターの活性が強く、さらにp53依存の転写サプレッサー（またはアンチセンス、リボザイム）の発現が低いのでそれによる目的遺伝子の発現の抑制もない。従って、その二重の効果で癌細胞特異的な遺伝子発現が期待できる、としている。しかしながら、公報に記載の実施例ではその特異性は低いといえる。この原因の一つは、目的遺伝子の発現を「down-regulation」するのに、転写以降のステップを抑制する手段（転写サプレッサー、リボザイム、アンチセンス）を用いたことによる、と考えられる。これらの手段では、目的遺伝子につながれたプロモーターが高い発現を与えない場合には、ある程度の効果は期待できるが、プロモーターの強度が増すほど、効果が低下する。従って、これら手段を用いる限り、実際の遺伝子治療に用いる高い発現強度と特異性は期待できないと考えられる。

また、大腸菌のCre-loxP組換え系の性質を組み合わせた癌特異的発現系も考案されている（佐藤ら、1997、第3回日本遺伝子治療学会講演要旨集、p49）。Creは、大腸菌のP1ファージの配列特異的なDNA組換え酵素であり、loxPはその標的配列である。CreはloxP配列を認識し、2つのloxP間でのDNA分子の組換えを行うため、この性質を利用して、大腸菌内だけでなく哺乳類細胞においても、遺伝子発現のスイッチのON/OFFが可能であることが知られている（Kilbyら、1993、Trends Genet., 9巻、413-421頁）。佐藤らの発現系においては、Creにより目的遺伝子が発現させるシステム「スイッチONシステム」が用いられている。すなわち、肝癌細胞特異的なAFPプロモーターの支配下にCre遺伝子が発現させるユニット、および、発現目的遺伝子とそのプロモーターの間にlox-転写終結シグナル-loxなる配列を挿入したユニットが用いられている。これら2つのユニットを細胞に導入したとき、肝癌細胞ではCreの発現が高いためlox間の組換えが多く起こり、その結果転写終結シグナルが切り離されて目的遺伝子の発現が高まる。これに対して、肝癌以外の

細胞ではCreの発現が低いのでlox間の組換えもあまり起こらず、目的遺伝子の発現も低い。それらの結果、AFPプロモーターの特異性は殆ど保たれたままで、発現強度が50-100倍高められた発現系が作出されたとされている。しかしながら、このシステムにおいては、発現強度の問題点は克服されているが、もう一つの問題である適用範囲については解決されていない。また、このような「スイッチONシステム」では、肝癌以外の細胞でも、わずかに起こる（肝癌細胞の1/100程度）AFPプロモーターからのCre発現のため、時間の経過と共に目的遺伝子の発現が高まり、特異性の面でも問題がある。この結果、例えば、目的遺伝子として自殺遺伝子を用いた場合、正常細胞への毒性が高まる懸念がある。

発明の開示

本発明は、特定の転写因子が存在しない細胞に特異的に任意の遺伝子を発現させる技術を提供することを課題とする。さらに、この技術を利用した、癌細胞に高い特異性を有し、正常細胞に対する悪影響が少ない、遺伝子発現技術を提供することを課題とする。

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、特定の転写因子に依存するプロモーターの下流に組み換え酵素遺伝子を配置した組み換え酵素の発現ユニットと、他のプロモーターの下流に発現させるべき所望の遺伝子と組み換え酵素の2つの標的配列を配置したユニットとを作製し、これらユニットを細胞に感染させることにより、特定の転写因子が存在する細胞では組み換え酵素が発現し認識配列間の組換えが起こるため目的遺伝子が欠失して遺伝子の発現が起こらないが、特定の転写因子が存在しない細胞では組み換え酵素が発現せず認識配列間の組換えが起こらないため目的遺伝子の発現が引き起こされるという、特定の転写因子が存在しない細胞に特異的な遺伝子発現技術を見いだすに至った。

さらに、本発明者等は、この遺伝子発現技術の癌治療への応用につき鋭意研究を行った結果、特定の転写因子に依存するプロモーターとして癌抑制因子に依存

するプロモーターを用い、発現させる所望の遺伝子として自殺遺伝子など癌細胞に毒性を示す遺伝子を用いることにより、癌細胞（癌抑制因子が存在しない細胞）特異的に毒性を示す遺伝子を発現させ、癌細胞を選択的に死滅させることが可能であることを見いだした。

即ち、本発明は、特定の転写因子が存在しない細胞に特異的な遺伝子発現技術、およびその癌治療への利用に関し、より具体的には、

1. (1) 特定の転写因子の存在下で作動するプロモーターと該プロモーター支配下に存在する組換え酵素をコードする遺伝子、(2) 発現可能な任意の遺伝子と該遺伝子周辺に存在する組換え酵素の2つの標的配列（但し、該2つの標的配列の間で組換えが起こった際に、該任意の遺伝子の発現が起こらなくなるように、該任意の遺伝子と該2つの標的配列が配置されている）とを有するベクター、
2. (1) 特定の転写因子の存在下で作動するプロモーターと該プロモーター支配下に存在する組換え酵素をコードする遺伝子と(2) 発現可能な任意の遺伝子と該遺伝子周辺に存在する組換え酵素の2つの標的配列とが同一分子上に存在する、(1) 記載のベクター、
3. (1) 特定の転写因子の存在下で作動するプロモーターと該プロモーター支配下に存在する組換え酵素をコードする遺伝子と(2) 発現可能な任意の遺伝子と該遺伝子周辺に存在する組換え酵素の2つの標的配列とが異なる分子上に存在する、(1) 記載のベクター、
4. 任意の遺伝子が、組換え酵素の2つの標的配列に挟まれている、(1) 記載のベクター、
5. 任意の遺伝子を支配するプロモーターが、組換え酵素の2つの標的配列に挟まれている、(4) 記載のベクター、
6. 特定の転写因子がガン抑制遺伝子の翻訳産物である、(1) 記載のベクター、
7. ガン抑制遺伝子がp53遺伝子である、(6) 記載のベクター、

8. 組換え酵素がCreであり、組換え酵素の標的配列がloxである、(1)記載のベクター、

9. 任意の遺伝子が自殺酵素をコードする遺伝子である、(1)記載のベクター、

10. 特定の転写因子がガン抑制遺伝子の遺伝子産物であり、任意の遺伝子が自殺酵素をコードする遺伝子である、(1)記載のベクター、

11. ガン抑制遺伝子がp53遺伝子である、(10)記載のベクター、

12. (1)～(11)に記載のベクターのいずれかが導入された宿主細胞、

13. (1)～(11)に記載のベクターをインビトロで宿主内に導入することを特徴とする、特定の転写因子が存在しない細胞を選択的に死滅させる方法、に関する。

なお、本発明において「転写因子」とは、特定の遺伝子の発現を促進する活性を有するタンパク質を指し、転写活性を失ったものは含まれない。また、本発明の「ベクター」は、1分子のベクターのみならず、2分子のベクターをも指す。さらに、本発明において「自殺遺伝子」とは、細胞を死に導くタンパク質またはRNAをコードする遺伝子を指し、それ自身が細胞を死に導くタンパク質またはRNAをコードする遺伝子（例えば、ジフテリアトキシン等の毒素遺伝子や、baxのようなアポトシス誘導遺伝子）および細胞毒性の低い化合物を毒性の高い化合物に変換する酵素の遺伝子（例えば、単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ遺伝子や大腸菌由来シトシンデアミナーゼ遺伝子）を含む。

本発明のベクターは、(1)特定の転写因子の存在下で作動するプロモーターと該プロモーター支配下に存在する組換え酵素をコードする遺伝子（以下、「第一ユニット」と称する）と発現可能な任意の遺伝子と該遺伝子周辺に存在する組換え酵素の2つの標的配列（以下、「第二ユニット」と称する）とを有する。

このため、導入される細胞内にベクター上のプロモーターを活性化する転写因

子が存在する場合、「第一ユニット」が機能して、組み換え酵素遺伝子が発現する。これに続いて、発現した組み換え酵素が、「第二ユニット」における任意の遺伝子の周辺に配置された2つの認識配列間の組み換えを引き起こし、任意の遺伝子が不可逆的に発現不可能となる。一方、ベクターが導入される細胞内にプロモーターを活性化する転写因子が存在しない場合には、「第一ユニット」において組み換え酵素の遺伝子が発現しないため、「第二ユニット」が機能して、任意の遺伝子が発現する。

従って、本発明のベクターを用いれば、特定の転写因子が存在する細胞において任意の遺伝子の発現を抑制することができる一方、特定の転写因子が存在しない細胞で任意の遺伝子を発現させることができる。なお、「第一ユニット」と「第二ユニット」は、一分子のベクター内に存在してもよく、それぞれ異なる分子のベクターに存在していてもよい。

本発明のベクターの「第一ユニット」のプロモーターに作用する「特定の転写因子」としては、「第二ユニット」の任意の遺伝子を発現させたい所望の細胞に存在せず、任意の遺伝子の発現を抑制したい所望の細胞に存在する転写因子であれば特に制限はない。例えば、癌抑制の機能を有する転写因子としては、多くの癌細胞において変異していることが知られているp53タンパク質、ウィルムス腫瘍や急性白血病で変異が見られるWT1 (Haberら、1990、Cell、61巻、1257-69頁；Underwoodら、1996、Blood、87巻、2171-79頁)、膵臓癌の多くで変異が見られるSmad4 (Liuら、1997、Genes & Dev.、11巻、3157-67頁)、および白血病で欠失が見られるIRF-1 (Willmanら、1993、Science、259巻、968-71頁) などを用いることが可能である。「プロモーター」としては、例えば転写因子がp53であれば、その支配下にあるWAF1遺伝子 (El-Dieryら、1993、Cell、75巻、817-825頁) やbax遺伝子 (Miyashitaら、1993、Cell、80巻、293-299頁) などの遺伝子のプロモーター、もしくは人工的に合成されたp53の結合コンセンサス配列 (El-Dieryら、1992、Nature Genet.、1巻、45-49頁) を含むプロモーターを、転写因子がWT1であ

れば、それに依存した発現を示すシンデカン1遺伝子のプロモーター (Cookら、1996、Oncogene、13巻、1789-99 頁) などを、Smad4であればプラスミノーゲン・アクチベーター・インヒビター1遺伝子のプロモーター (Dennlerら、1998、Embo J、17巻、3091-3100頁) を、IRF-1であれば二重鎖RNA依存プロテインキナーゼ遺伝子のプロモーター (Berettaら、1996、Oncogene、12巻、1593-96頁) を用いることが可能である。また、該プロモーターの支配下に存在する「組換え酵素をコードする遺伝子」としては、例えば、大腸菌P1ファージの組換え酵素Creの遺伝子や、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の組換え酵素FLP、酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) の組換え酵素Rなどの遺伝子が挙げられる (Kilbyら、1993、Trends Genet.、9巻、413-421頁)。好ましくは、37°Cでの組換え効率の良いCreの遺伝子が用いられる (Buchholzら、1996、Nucleic Acids Res.、24巻、4256-4262頁)。

また、本発明のベクターの「第二ユニット」における「発現可能な任意の遺伝子」としては、通常、プロモーターの下流に接続された任意の遺伝子である。

「第二ユニット」において用いられるプロモーター (いわゆるエンハンサー部分も含む) としては、動物細胞で機能するものなら、いかなるものでも用いることができる。好適には、広範な種類の細胞で強力な発現を与えるもの、例えば、E1a遺伝子のプロモーター (Zabnerら、1996、Gene Ther.、3巻、458-465頁)、サイトメガロウィルスの初期遺伝子のプロモーター (Dollら、1996、Gene Ther.、3巻、437-447頁) や、ニワトリのアクチン遺伝子のプロモーターにサイトメガロウィルスの初期遺伝子のエンハンサーを接続したCAGプロモーター (Niwaら、1991、Gene、108巻、193-200頁) などが用いられる。目的によっては、組織特異的に強い発現を与えるプロモーターを用いることができる。任意の遺伝子としては、例えば、第一ユニットのプロモーターが癌抑制因子が結合するプロモーターであれば、癌細胞の殺傷のため、ジフテリアトキシンA鎖遺伝子 (Maxwellら、1986、Cancer Res. 46巻、4660-4664頁)、単純ヘルペスウィルス由来チミジンキナーゼ

遺伝子 (Fieldら、1983、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、80巻、4139-4143頁)、大腸菌由来シトシンデアミナーゼ遺伝子 (Mullenら、1992、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89巻、33-37頁) などの自殺遺伝子が用いられる。

また、「組換え酵素の標的配列」としては、例えば、組換え酵素がCreであればloxP配列であり、FLPであればFRT配列であり、RであればR-target配列である (Kilbyら、1993、Trends Genet.、9巻、413-421頁)。組換え酵素の標的配列は、二つの標的配列の間で組換えが起こった際に、上記の任意の遺伝子の発現が起こらなくなるように配置されている。例えば、二つの標的配列は、任意の遺伝子を挟み込むように配置されていてもよく、また、任意の遺伝子の発現を制御するプロモーターを挟み込むように配置されていても良い。

これら二つのユニットを挿入するためのベクターとしては、例えば、遺伝子治療などに用いる場合にはアデノウィルスベクター (Miyakeら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93巻、1320-1324頁; Kanegaeら、1996、Acta Paediatr. Jpn.、38巻、182-188頁) やレトロウィルスベクター (脇本ら、1995、蛋白質核酸酵素、40巻、2508-2513頁)、アデノ随伴ウィルスベクター (玉寄ら、1995、蛋白質核酸酵素、40巻、2532-2538頁)、プラスミドベクター (Zerrouqiら、1996、Cancer Gene Ther.、3巻、385-392頁) などを用いることができる。これらは既に確立された方法で、効率的に生産することができる。

ベクターが導入される宿主細胞は、例えばベクターを癌治療などに用いる場合には、癌患部の細胞 (および、結果的にその周辺の正常細胞) である。本発明のベクターを癌治療に用いる場合、具体的には、例えばプロモーターとしてはp53依存プロモーターを、第2ユニットの遺伝子としては自殺遺伝子である単純ヘルペスウィルス由来チミジンキナーゼ遺伝子を用いる。このベクターは、例えばp53を欠損する癌患部に対し、直接、あるいは血管経由で運搬される。一定時間の後に自殺遺伝子産物の基質であるガンシクロビルを、癌患部周辺、あるいは全身に投与する。癌細胞では自殺遺伝子が発現してガンシクロビルが毒性を発揮し細胞が

死滅するが、正常細胞では自殺遺伝子が発現せず、細胞は死滅しない。

また、このベクターは、癌の化学療法強化（Eckertら、1996、Blood、88巻、3407-3415頁）等のための癌患者由来の骨髄細胞の移植の際などに、ex vivoでのp53欠損癌細胞の選択的死滅にも用いることができる。

p53の活性は、細胞内外の環境の変化に対応して様々な制御を受ける事が知られている。例えばUV照射、制癌剤、酸素不足、高熱、細胞の老化等は、p53の活性を高めることが知られている。また、細胞内因子としてmdm2やプロテアソーム、カルパインはp53の活性を低下させ、ref1、サイクリンE、CBPなどはp53の活性を上昇させることが知られている（Levineら、1997、Cell、88巻、323-331頁；Jayaramanら、1997、Genes & Dev.、11巻、558-570頁；Guら、1997、Nature、387巻、819-827頁；Selivanovaら、1997、Nature Med.、3巻、632-638頁）。

従って、このようなp53の活性制御の知識を利用することにより、例えば制癌剤を投与することにより、p53正常細胞中のp53の活性を上昇させ、その結果Cre-loxP反応による発現抑制効果を更に高め、正常細胞と癌細胞における発現の差をより大きくすることが可能である。

図面の簡単な説明

図1は、pRLSVb-p53RE8の構築過程を示す図である。

図2は、p53依存Cre発現ユニットの構築過程を示す図である。

図3は、レポーターユニットの構築過程を示す図である。

図4は、「AxCAYLTK」を感染させたp53欠損細胞および発現細胞におけるガンシクロビル（GCV）感受性に対する「AxYp53RECre」の効果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例1]ベクターの構築

1) p53依存発現ユニットの構築

1-1) p53結合領域の作製 (図1)

制限酵素BglII、XhoI、SmaI、Asp718、およびSphIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチドBS1 (GATCTCTCGAGCCCGGGGTACCGCATG : 配列番号1) および合成オリゴヌクレオチドSB1 (CGGTACCCCGGGCTCGAGA : 配列番号2) をT4ポリヌクレオチドキナーゼで処理し、5'末端にリン酸基を付与した。また、SV40初期プロモーターを含むプラスミドpRL-SV40 (プロメガ社、米国) を制限酵素BglIIおよびSphIで切断し、SV40初期プロモーターの基本プロモーター部分は含むが、エンハンサー部分は含まない3.5kbの断片を単離した。BS1およびSB1をアニールさせ、該断片と連結した。合成オリゴヌクレオチドに由来する配列の塩基配列を決定し、配列の過ちのないクローンを選択した。このプラスミドを「pRLSVb」と名づけた。

p53認識配列を含む合成オリゴヌクレオチド53REF (TCGAGGGACTTGCTGGACTTGCC TGTCGACG : 配列番号3) および53RER (GTACCGTCGACAGGCAAGTCCAGGCAAGTCCC : 配列番号4) をT4ポリヌクレオチドキナーゼで処理し、5'末端にリン酸基を付与した後、両者をアニールさせた。アニール産物の末端はXhoIおよびAsp718の突出配列と同じであり、またAsp718突出配列の隣にSalI認識配列を有する。このアニール産物を「pRLSVb」の制限酵素XhoI-Asp718部位間にクローニングした。挿入配列の塩基配列を決定し、配列の過ちのないクローンを選択した。このプラスミドを「pRLSV-p53RE1」と名づけた。

「pRLSV-p53RE1」をSalIおよびNheI (pRLSVbプラスミド内に1カ所認識部位をもつ) で切断し、p53認識配列とアンピシリン耐性遺伝子、およびプラスミドの複製開始点を有する3.0kbの断片を単離した。また、「pRLSV-p53RE1」をXhoIおよびNheIで切断し、p53認識配列を有する0.5kbの断片を単離した。両者を連結し、「pRLSVb」のXhoI-Asp718部位間に2コピーのp53認識配列を有するプラスミドを調製した。このプラスミドを「pRLSV-p53RE2」と名づけた。

次に、「pRLSV-p53RE2」をSalIおよびNheIで切断し、2コピーのp53認識配列とアンピシリン耐性遺伝子、およびプラスミドの複製開始点を有する3.0kbの断片を単離した。また、「pRLSV-p53RE2」をXhoIおよびNheIで切断し、2コピーのp53認識配列を有する0.5kbの断片を単離した。両者を連結し、「pRLSVb」のXhoI-Asp718部位間に4コピーのp53認識配列を有するプラスミドを調製した。このプラスミドを「pRLSV-p53RE4」と名づけた。

さらに、「pRLSV-p53RE4」をSalIおよびNheIで切断し、4コピーのp53認識配列とアンピシリン耐性遺伝子、およびプラスミドの複製開始点を有する3.1kbの断片を単離した。また、「pRLSV-p53RE4」をXhoIおよびNheIで切断し、4コピーのp53認識配列を有する0.6kbの断片を単離し、両者を連結した。その結果、「pRLSVb」のSV40初期プロモーター由来の基本プロモーターの上流(XhoI-Asp718部位間)8コピーのp53認識配列を有するプラスミドを調製した。このプラスミドを「pRLSV-p53RE8」と名づけた。

1-2) ウサギ β グロビン遺伝子の転写終結領域のクローニング (図2)

制限酵素XhoI、MluI、PmeIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチドRGF (TCC CTCGAGACGCGTGTTTAAACCAATGCCCTGGCTCACAAATACC : 配列番号5)、および制限酵素SalI、MscI、NheIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチドRGR (TCCGTCGACTGGC CAGCTAGCGGCATATGTTGCCAACTCTAAAC : 配列番号6)をプライマーに、プラスミドpBI (クロンテック社、米国)を鋳型にしたPCRを行い、pBI中のウサギ β グロビン遺伝子の転写終結部位を含む領域(0.25kb)を増幅し、単離した。これを制限酵素SalIおよびXhoIで切断し、プラスミドpRLSV-p53RE8のXhoI部位にクローン化した。挿入配列の塩基配列を決定し、転写終結シグナルの方向とプロモーターの方向が一致し、かつ変異のないクローンを選択した。このプラスミドを「pRLSV-GAp53RE8」と名づけた。

1-3) イントロンのクローニング (図2)

制限酵素XhoI、MluI、HindIIIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチドInF

(TCCCTCGAGACGCGTAAGCTTTATTGCGGTAGTTTATCA : 配列番号7)、および制限酵素Sacl、EagIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチドInR (TCCGAGCTCCGGCCGAGTACTCTAGCCTTAAGAGCTGTA : 配列番号8) をプライマーに、プラスミドpCI-neo (プロメガ社) を鋳型にしたPCRを行い、pCI-neo中のヒト・ベータグロビン遺伝子およびヒト・イムノグロブリン遺伝子のイントロンを含む領域 (0.35kb) を増幅し、単離した。これを制限酵素SacIおよびXhoIで切断し、プラスミドpSP72 (2.4kb ; プロメガ社) のSacI-XhoI部位間にクローン化した。挿入配列の塩基配列を決定し、変異のないクローンを選択した。このプラスミドを「pSP-Int」と名づけた。

1-4) ウシ成長ホルモン遺伝子の転写終結領域のクローニング (図2)

制限酵素SacI、PmlIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチドPA2F (TCCGAGCTCCACGTGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGC : 配列番号9)、および制限酵素BglII、PmeI、Asclの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチドPA2R (TCCAGATCTGTTTAAACGGCGCGCCA AAGCCCCAAAAACAGGAAGA : 配列番号10) をプライマー、プラスミドpRc/CMV (インビトロジェン社、米国) を鋳型にしたPCRを行い、pRc/CMV中のウシ成長ホルモン遺伝子の転写終結部位を含む領域 (0.8kb) を増幅し、単離した。これを制限酵素SacIおよびBglIIで切断し、プラスミドpSP72のSacI-BglII部位間にクローン化した。挿入配列の塩基配列を決定し、変異のないクローンを選択した。このプラスミドを「pSP-pA2」と名づけた。

1-5) 各ユニットの連結 (図2)

「pSP-pA2」を制限酵素SacIおよびBglIIで切断し、ウシ成長ホルモン遺伝子の転写終結部位を含む0.8kbの断片を単離した。一方、「pSP-Int」を同じく制限酵素SacIおよびBglIIで切断し、イントロン、プラスミドのレプリコン、およびアンピシリン耐性遺伝子を含む2.8kbの断片を単離した。両者を連結し、イントロンとウシ成長ホルモン遺伝子の転写終結部位を含むプラスミドを調製した。このプラスミドを「pSP-InpA2」と名づけた。

「pRLSV-GAp53RE8」を制限酵素MluIおよびHindIIIで切断し、ウサギβグロビン

遺伝子の転写終結部位、p53結合部位、およびSV40基本プロモーターを含む0.8 kbの断片を単離した。これを「pSP-InpA2」のMluI-HindIII部位間（イントロンの5'側に位置）にクローニングした。このプラスミドを「p53REIpA」と名づけた。

「p53REIpA」はウサギ β グロビン遺伝子の転写終結部位（1）-p53結合部位/SV40基本プロモーター/イントロン（2）-ウシ成長ホルモン遺伝子の転写終結部位（3）のユニットを含む。（2）-（3）間には、3つの制限酵素認識部位（EagI、SacI、PmlI）を有する。

1-6) 遺伝子の挿入 (図2)

1-6a) NLS（核移行シグナル）-Cre遺伝子の構築と挿入

SV40由来の核移行シグナルペプチド（PKKKRKV）に対応する塩基配列と制限酵素HindIII、EagIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチドCreF（TGAAAGCTTCGGCCGCCACCATGCCCAAGAAGAAGCGCAAGGTGTCCAATTTACTGACCGTACACCAA：配列番号11）および制限酵素SacIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチドCreR（TCCGAGCTCCTAATCGCCATCTTCCAGCAGGCG：配列番号12）をプライマー、大腸菌BM25.8株（アマーシャム社、英国）より調製したDNAを鋳型にして、PCRを行った。BM25.8株はP1ファージの溶原株で、Cre遺伝子を含んでいる。PCR増幅産物を単離後、制限酵素EagIおよびSacIで切断し、p53REIpAのEagI-SacI部位間にクローニングした。挿入配列の塩基配列を決定し、変異のないクローンを選択した。このプラスミドを「p53RECre」と名づけた。

1-6b) LacZ遺伝子の挿入

pCMVbeta（クロンテク社）を制限酵素NotIおよびPstIで切断後、3.5kbのDNA断片を単離した。該断片を「p53REIpA」のEagI部位にクローニングした。制限酵素切断パターンを調べ、目的の方向に挿入されたクローンを選択した。このプラスミドを「p53RELZ」と名づけた。

1-7) ユニットを含む組換えアデノウィルスベクターの作製

組換えアデノウィルスの作製は、基本的に斎藤らの方法（Miyakeら、1996、Pr

oc.Natl. Acad. Sci. USA、93巻、1320-24頁；鐘ヶ江ら、バイオマニュアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法、1994、43-58頁、羊土社）に従った。以下に具体的な実施例を記す。

アデノウイルス（Ad）5型ゲノムのほぼ全長からE1及びE3領域を除く31kbのAdDNAを持つ42KbのコスミドpAdex1cw（鐘ヶ江ら、1994、細胞工学、13巻、8号、757-763頁）を、SwaIで切断し、ゲル濾過にて脱塩した。また、「p53RECre」または「p53RELZ」をPmeIで切断し、p53依存のCreまたはLacZ遺伝子発現ユニットを含む切断産物（各々2.9、5.3kb）を単離した。両者をT4リガーゼによる連結反応に供した後、酵素を熱失活し、ゲル濾過にて脱塩し、SwaIによる切断反応を行った。切断産物はフェノールによる酵素失活処理後脱塩し、再びSwaIで切断した。その一部についてギガバックXLキット（ストラタジーン社、米国）によるインビトロ・パッケージングを行い、連結産物を大腸菌に導入した。得られたアンピシリン耐性形質転換株のいくつかについてコスミドを調製し、制限酵素消化によりその構造を調べ、p53依存発現ユニットが目的の方向（E1A、E1Bの転写と逆方向）に挿入された組換えコスミドを単離した。それらをpAdp53RECre、または「pAxYp53RELZ」と名づけた。

一方、E1及びE3領域を欠くアデノウイルス5型（Ad5 d1X株）のDNA-末端蛋白質複合体（DNA-TPC）を斎藤らの方法（鐘ヶ江ら、1994、バイオマニュアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法、43-58頁、羊土社）により調製した。これを制限酵素EcoT22Iで消化し、ついでゲル濾過により脱塩処理した。

「pAxYp53RECre」（または「pAxYp53RELZ」）とEcoT22I消化Ad5 d1XDNA-TPCを混合し、セルフェクトキット（ファルマシア社、スウェーデン）を用いて、293細胞に導入した。翌日、トランスフェクションした293細胞を懸濁し、その懸濁液、および10倍ないし100倍希釈液（293細胞懸濁液にて希釈）を96穴プレートにまいた。約2週間後に、293細胞内での組換えによって生じた組換えアデノウイルスの増殖が見られたウェルから、死滅細胞を含む培養液を取り出した。それを数回凍

結融解し、アデノウイルス粒子を細胞から放出させた。その遠心上清液（1次ウイルス液）を、24穴プレートにまいた293細胞に感染させた。3日後に死細胞を含む培養液を取り出し、一部は1次ウイルス液作成の要領で凍結融解し、遠心上清液を得た（2次ウイルス液）。残りの培養液を遠心し、細胞を得た。それよりDNAを調製し、制限酵素切断によって組換えアデノウイルスDNAの構造を検討し、目的の構造が確認されたクローンを選択した。それらを各々、「AxYp53RECre」、「AxYp53RELZ」と名づけた。その2次ウイルス液を用いて、より多量の293細胞に感染させた。その培養液を同様に凍結融解、遠心し、3次ウイルス液を得た。3次ウイルス液について、斎藤らの方法（鐘ヶ江ら、1994、バイオマニュアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法、43-58頁、羊土社）により、力価を測定した。

2) p53発現組換えアデノウイルスベクターの作製

2-1) p53cDNAのクローニング

ヒトの精巣由来polyA(+)RNA（クロンテック社）を鋳型、オリゴdTをプライマーに用いて、スーパースクリプト・ブレアンプリフィケーションシステム（ギブコ・ビーアールエル社、米国）による1本鎖cDNA合成を行った。そのcDNA混合物を鋳型、制限酵素XbaIの認識配列を含むオリゴヌクレオチド・P53F（AGCTTCTAGACAGCCAGACTGCCTCCGGGTCAGTGC：配列番号13）および制限酵素XbaIの認識配列を含むオリゴヌクレオチド・P53R（GTTCTAGACCCCATGTAATAAAAGGTG：配列番号14）をプライマーとしてPCRを行った。増幅産物を制限酵素XbaIで切断し、p53のオープンリーディングフレームを含むDNA断片（1.7kb）を単離し、pBluescriptII SK(-)プラスミド（ストラタジーン社）のXbaI部位にクローニングした。挿入配列の塩基配列を決定し、アミノ酸レベルで変異のないクローンを選択した。このプラスミドを「pBS-p53」と名づけた。

2-2) 組換えアデノウイルスベクターの作製

「pBS-p53」をXbaIで切断し、p53cDNAを含む断片を単離し、末端部をDNAランディングキット（宝酒造社、日本）にて平滑化した。また、Ad5型ゲノムのほぼ全

長からE1及びE3領域を除く31kbのAddNA、およびCAGプロモーター・転写終結領域を持つ44KbのコスミドpAdex1CA（鐘ヶ江ら、1994、細胞工学、13巻、8号、757-763頁）を、SwaIで切断し、ゲル濾過にて脱塩した。

これらp53cDNA、コスミド両断片を用いて、1-7)と同様にして組換えコスミドを作製した。これを「pAxCAYp53」と名づけた。これを用いて、1-7)項に記した方法で、CAGプロモーター-p53遺伝子-転写終結領域を含む組換えアデノウィルスを作製した。これら組換えアデノウィルスを「AxCAYp53」と名づけた。

3) レポーター用アデノウィルスベクターの構築

3-1) CMVエンハンサー／プロモーターのクローニング (図3)

制限酵素Asp718、AscI、ScaI、FseIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチド・CMF (TCAGGTACCGGCGGCCAGTACTGGCCGGCCCGTTACATAACTTACGGTAAATGG : 配列番号15) および制限酵素EcoRIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチド・CMR (TCCGAATTCGTACAATTCGCGAGCTTTTAGAGC : 配列番号16) をプライマーに、プラスミドpCMVbeta (クロンテック社、米国) を鋳型にしたPCRを行い、pCMVbetaのエンハンサー／プロモーター／イントロン領域 (サイトメガロウィルスの最初期プロモーターのエンハンサーとプロモーター+SV40ウィルスのイントロン ; 0.8kb) を増幅し、単離した。該断片を制限酵素Asp718およびEcoRIで切断後、pBluescriptII SK(-) プラスミド (ストラタジーン社) のAsp718-EcoRI部位間にクローニングした。挿入配列の塩基配列を決定し、変異のないクローンを選択した。このプラスミドを「pBS-CMV」と名づけた。

3-2) SV40ウィルス後期遺伝子転写終結領域のクローニング (図3)

制限酵素SacII、Sse8387Iの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチド・PA3F (TGCCGCGGCCTGCAGGCAGACATGATAAGATACATTGATG : 配列番号17) および制限酵素SacI、ScaI、AscIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチド・PA3R (TCCGAGCTCAGTACTGCGCGCCAAAAACCTCCACACCTCCCCCT : 配列番号18) をプライマーに、プラスミド「pCMVbeta」を鋳型にしたPCRを行い、「pCMVbeta」中のSV40ウィルス後期遺伝子

転写終結領域 (0.2kb) を増幅し、単離した。該断片を制限酵素SacIおよびSacIIで切断後、pBluescriptII SK(-)のSacI-SacII部位間にクローニングした。挿入配列の塩基配列を決定し、変異のないクローンを選択した。このプラスミドを「pBS-pA3」と名づけた。

3-3) loxP配列の合成とクローニング (図3)

loxP配列と制限酵素EcoRI、SmaI、NotIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチドL1F (AATTCATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATCCCGGGGC : 配列番号19) およびL1R (GGCCGCCCCGGGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATG : 配列番号20) をT4ポリヌクレオチドキナーゼで処理し、5'末端にリン酸基を付与した。その後両者をアニールさせた後、pBS-CMVのEcoRI-NotI部位間にクローニングした。挿入配列の塩基配列を決定し、配列の過ちのないクローンを選択した。このプラスミドを「pBS-CMVL」と名づけた。

また、loxP配列と制限酵素NotI、SalI、SpeI、Sse8387Iの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチドL2F (GGCCGCGTCGACATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATACTAGTCCTGCA : 配列番号21) およびL2R (GGACTAGTATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGTCGACGC : 配列番号22) を同様にT4ポリヌクレオチドキナーゼで処理し、アニールさせた後、「pBS-pA3」のSse8387I-NotI部位間にクローニングした。挿入配列の塩基配列を決定し、配列の過ちのないクローンを選択した。このプラスミドを「pBS-LpA3」と名づけた。

3-4) レポーター構築用プラスミドベクターの作製 (図3)

「pBS-CMVL」を制限酵素Asp718およびNotIで切断し、CMVプロモーター部分およびloxP配列を含む0.9kbの断片を単離した。また、「pBS-LpA3」をAsp718およびNotIで切断し、loxP配列、SV40ウィルス後期遺伝子転写終結領域、およびプラスミドの複製開始領域と選択マーカを含む3.2kbの断片を単離した。両断片が連結されたプラスミドを単離し、「pBS-CLLA」と名づけた。このプラスミドはCMVエンハンサー／プロモーター／SV40イントロン領域-2つのloxP-SV40ウィルス後期遺伝子

転写終結領域からなるユニットを含む。2つのloxPの間には制限酵素SmaI（またはXmaI）、NotI、およびSalIの認識配列が配されている。

3-5) ベータ・ガラクトシダーゼ遺伝子を含むレポーターベクターの作製（図3）

プラスミド「pCMVbeta」を制限酵素SmaI、NotI、およびPstIで切断後、大腸菌のベータ・ガラクトシダーゼ遺伝子を含む3.4kbの断片を単離した。この断片を「pBS-CLLA」のSmaI-NotI部位間にクローニングした。このプラスミドを「pLoxLZ」と名づけた。

3-6) ベータ・ガラクトシダーゼ遺伝子とG418耐性遺伝子を発現するプラスミドの作製（図3）

大腸菌のベータ・ガラクトシダーゼ（LacZ）遺伝子とG418耐性（Neo）遺伝子とを同時に発現するプラスミドの作製を行った。

そのため、pLoxLZの第2（3'側）のloxP配列と転写終結領域との間にIRES（Internal Ribosome Entry Site）配列に連結したG418耐性遺伝子を挿入した。IRES配列は、ウィルスによく見られる配列で、リボソームの結合配列を有する。この下流に位置する遺伝子は、転写されれば、CAP構造が付近になくとも、効率的に翻訳される。従って、一つの転写単位から複数の遺伝子産物を発現させることができる。

制限酵素SpeI、BspHIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチド・NeF（TCCACTAGTTCATGATTGAACAAGATGGATTGCAC：配列番号23）および制限酵素EcoRI、Sse8387I、BamHIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチド・NeR（TTCCGAATTCCTGCAGGGGATCCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCG：配列番号24）をプライマーに、プラスミドpCI-neo（プロメガ社、米国）を鋳型とするPCRを行い、pCI-neo中のG418耐性遺伝子（0.8 kb）を増幅し、単離した。該断片を制限酵素SpeIおよびEcoRIで切断後、pBlue scriptII SK(-)のSpeI-EcoRI部位間にクローニングした。挿入配列の塩基配列を決定し、変異のないクローンを選択した。このプラスミドを「pBS-Neo」と名づけ

た。

また、制限酵素SpeIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチド・IRF (TCCACTA GTGTTATTTTCCACCATATTGCCGTC : 配列番号25) および制限酵素BamHI、NcoIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチド・IRR (TCAGGATCCCCATGGCCATGGTATTATCATCGT : 配列番号26) をプライマー、プラスミドpCITE-2(a) (ノバジェン社、米国) を鋳型とするPCRを行い、pCITE-2(a)中のIRES領域 (0.5 kb) を増幅し、単離した。該断片を制限酵素SpeIおよびBamHIで切断後、pBluescriptII SK(-)のSpeI-BamHI部位間にクローニングした。挿入配列の塩基配列を決定し、変異のないクローンを選択した。このプラスミドを「pBS-IRES」と名づけた。

「pBS-IRES」を制限酵素SpeIおよびNcoIで切断し、IRES領域を含む0.5kbの断片を単離した。この断片を「pBS-Neo」のSpeI-BspHI部位間 (G418耐性遺伝子の5' 末端に位置) にクローニングし、IRES領域の3' 末端にG418耐性遺伝子が連結されたプラスミドを作製した。このプラスミドを「pBS-IRNeo」と名づけた。

次に、「pBS-IRNeo」を制限酵素SpeIおよびSse8387Iで切断し、IRES領域およびG418耐性遺伝子を含む0.8kbの断片を単離し、pLoxLZのSpeI-Sse8387I部位間 (2番目のloxPとSV40ウィルス後期遺伝子転写終結領域の間に位置) にクローニングした。得られたプラスミドを「pLoxLZIRNeo」と名づけた。このプラスミドは、CMVエンハンサー／プロモーター／SV40イントロン領域-loxP-LacZ-loxP-IRES-Neo-SV40ウィルス後期遺伝子転写終結領域の構造を持つ。

3-7) ルシフェラーゼ遺伝子を含むレポーターベクターの作製

プラスミドpGEM-luc (プロメガ社、米国) を制限酵素NotI、およびSalIで切断後、ホタルのルシフェラーゼ遺伝子を含む1.7kbの断片を単離した。この断片を「pBS-CLLA」のNotI-SalI部位間にクローニングした。このプラスミドを「pLoxLuc」と名づけた。

3-8) 単純ヘルペスウィルス・チミジンキナーゼ遺伝子を含むベクターの作製

制限酵素SrfIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチド・TKF (TGAGCCCGGGCCG

CCACCATGGCTTCGTACCCCTGCCAT : 配列番号27) および制限酵素NotIの認識配列を含む合成オリゴヌクレオチド・TKR2 (TCCTACTAGTGCGGCCGCTCAGTTAGCCTCCCCCATCTC : 配列番号28) をプライマーに、プラスミドpHSV106 (ライフテック社、米国) を鋳型にしたPCRを行い、pHSV106の単純ヘルペスウイルスI型のチミジンキナーゼ遺伝子の翻訳配列 (HSVTK ; 1.1kb) を増幅し、単離した。該断片を制限酵素SrfIおよびNotIで切断後、「pBS-CLLA」のSmaI-NotI部位間にクローニングした。挿入配列の塩基配列を決定し、変異のないクローンを選択した。このプラスミドを「pLoxTK」と名づけた。

3-9) レポーター用アデノウィルスベクターの構築

「pLoxLZ」、または「pLoxluc」を制限酵素ScaIで切断し、CMVエンハンサー／プロモーター／SV40イントロン領域-loxP-LacZ (またはルシフェラーゼ遺伝子) -loxP-IRES-Neo-SV40ウィルス後期遺伝子転写終結領域を含む4.6kb、または2.7kbのDNA断片を単離した。この断片を、1-7) に記した方法でpAdex1cwのSwaI部位に挿入し、組換えコスミドを得た。これらを「pAxCMLLZ」、または「pAxCMLluc」と名づけた。これを用いて、1-7) に記した方法で、上記ユニットを含む組換えアデノウィルスを作製した。これら組換えアデノウィルスを「AxYCMLLZ」、または「AxYCMLluc」と名づけた。

また、「pLoxLZ」および「pLoxTK」を制限酵素EcoRIおよびSpeIで切断し、loxP-LacZ-loxPおよびloxP-HSVTK-loxPを含む3.6kbおよび1.2kbのDNA断片を単離した。末端部をDNAブランディングキット (宝酒造社、日本) にて平滑化した。これら断片を1-7) に記した方法でpAdex1CAのSwaI部位に挿入し、組換えコスミドを得た。これらの組換えコスミドのうち、CAGプロモーターの方向とHSVTK遺伝子の方向が一致するものを「pAxCAYLLZ」および「pAxCAYLTK」と名づけた。これらを用いて、1-7) に記した方法で、上記ユニットを含む組換えアデノウィルスを作製した。これら組換えアデノウィルスを「AxCAYLLZ」「AxCAYLTK」と名づけた。

[実施例2] 評価用細胞の作製

p53を欠損するヒトの骨肉腫由来の細胞Saos2 (ATCCセルライン・アンド・ハイブリドーマズ、第8版、1994、282頁、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション) に、CMVエンハンサー／プロモーター／SV40イントロン領域-loxP-LacZ-loxP-IRES-Neo-SV40ウィルス後期遺伝子転写終結領域からなるユニットの挿入を試みた。

プラスミド「pLoxLZIRNeo」を制限酵素BsaI (上記ユニット以外の領域を切断) で切断し、直鎖状にした。0.4cm幅のジーンバルサーキューベット (バイオラッド社、米国) に、K-PBSバッファー (岩本ら、バイオマニユアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法、1994、23-28頁、羊土社) に懸濁したSaos2懸濁液 (1×10^5 cell / ml) 0.4 ml、およびBsaI切断「pLoxLZIRNeo」 0.01 mgを入れ、ジーンバルサーII (バイオラッド社) により250 V、0.95 mFDのパルスをかけた。その後懸濁液に培地 (マッコイ5A + 15% 胎仔牛血清) 9mlを加え、37°Cで培養した。3日後、細胞をトリプシン処理によりG418を0.8 mg/ml含む培地に懸濁し、10cmディッシュ10枚にまいてさらに培養を続けた。その17日後に、コロニーを複数単離し、G418を0.4 mg/ml含む0.4 mlの培地に懸濁して、48穴のプレートに入れ、培養を続けた。このようなG418耐性クローンのいくつかについて、X-gal染色を行い、LacZの発現の良好なクローンを選択した。これらG418耐性かつLacZ (+) のクローンのいくつかについてゲノムDNAを調製し、適当な制限酵素で切断し、ナイロンメンブレンにブロットした。これを、標識したLacZ遺伝子DNAとハイブリダイズさせ、その強度から、1細胞当たりの挿入ユニット数を推定した。挿入ユニット数が1と判定されたクローン (A8aと名づけた) を以後の実験に用いた。

[実施例3] 発現試験

1) p53依存プロモーターによる発現

アデノウィルスベクターに搭載した状態でのp53依存プロモーターの誘導能を検討した。前日にSaos2またはヒト胎児包皮由来細胞であるHs68 (ATCCセルライン・アンド・ハイブリドーマズ、第8版、1994、282頁、アメリカン・タイプ・カルチャー

・コレクション) をウェル当たり 4×10^5 細胞播種した6穴プレートに対し、「AxYp53RELZ」、および「AxCAYp53」を標記のMOI (multiplicity of infection) で感染させた。感染方法は、鐘ヶ江らの方法 (バイオマニュアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法、1994、43-58頁、羊土社) に従った。3日後に感染細胞の粗抽出液を調製し、ガラクトンプラスキット (トロピクス社、米国) を用いて、 β ガラクトシダーゼ活性を測定した。表1にその結果を示す。

表 1

No	細胞	AxCAYp53 (MOI)	AxYp53RELZ (MOI)	β ガラクトシダーゼ (RLU/s/ug)
1	Saos2 (p53-)	0	0	0
2		0	100	12
3		10	0	0
4		10	100	284611
5	Hs68 (p53+)	0	0	0
6		0	100	347741
7		10	0	0
8		10	100	452385

このプロモーターはp53により強力に誘導されること、また、p53陽性細胞の場合、内在性p53のみでp53依存プロモーターが十分に誘導されることが示された。

2) p53依存の発現抑制 ; 評価系1

CMVプロモーター-loxP-LacZ遺伝子-loxP-転写終結シグナルからなるユニットが細胞のゲノムに挿入されたp53欠損細胞「A8a」、「AxCAYp53」、および「AxYp53RELZ」を用いて、p53依存のLacZ発現の抑制を検討した。前日にA8aをウェル当たり 4×10^5 細胞播種した6穴プレートに対し、各種組換えアデノウィルスで標記のMOIで感染させた。7日後に感染細胞の粗抽出液を調製し、1)と同様に β ガラクトシダーゼ活性を測定した。表2に相対活性で表したその結果を示す。

表 2

No	細胞	AxCAYp53 (MOD)	AxYp53RELZ (MOD)	β ガラクトシダーゼ (ratio)
1	A8a	0	0	1
2		0	100	0.91
3	A8a	30	0	1
4		30	100	0.17

この細胞では、p53-のときには「AxYp53RELZ」による発現抑制は見られないが、p53を発現させた場合には「AxYp53RELZ」による発現抑制が観察された。

3) p53依存の発現抑制；評価系2

CMVプロモーター-loxP-LacZ遺伝子（またはルシフェラーゼ遺伝子）-loxP-転写終結シグナルからなるユニットを含む組換えアデノウィルス（「AxYCMMLZ」、または「AxYCMMLuc」）、「AxCAYp53」、および「AxYp53RECre」を用いて、p53依存のLacZ発現の抑制を検討した。前日にSaos2をウェル当たり 4×10^4 細胞播種した6穴プレートに対し、「AxCAYp53」および「AxYp53RECre」を標記のMOIで感染させた。その翌日、「AxYCMMLZ」、または「AxYCMMLuc」を感染させた。その5日後に感染細胞の粗抽出液を調製し、1)と同様に β ガラクトシダーゼ活性、またはプロメガ社製アッセイシステムによりルシフェラーゼ活性を測定した。表3および4に相対活性で表したその結果を示す。

表 3

No	細胞	AxYCMMLZ (MOD)	AxCAYp53 (MOD)	AxYp53RECre (MOD)	β ガラクトシダーゼ (ratio)
1	Saos2	10	0	0	1
2		10	0	100	1.47
3	Saos2	10	10	0	1
4		10	10	100	0.09

表 4

No	細胞	AxYCMlluc (MOI)	AxCAYp53 (MOI)	AxYp53RECre (MOI)	ルシフェラーゼ (ratio)
1	Saos2	3	0	0	1
2		3	0	100	0.94
3	Saos2	3	10	0	1
4		3	10	100	0.12

2)と同様に、この細胞ではp53-のときには「AxYp53RECre」による発現抑制は見られないが、p53を発現させた場合には「AxYp53RECre」による顕著な発現抑制が観察された。

4) p53依存の発現抑制；評価系3

CMVプロモーター-loxP-LacZ遺伝子-loxP-転写終結シグナルからなるユニットを含む組換えアデノウィルス、および各種p53+ (Hs68、IMR90(ヒト肺由来細胞;ATCCセルライン・アンド・ハイブリドーマズ,第8版,1994,100頁,アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション)) または-細胞 (Saos2、J82(ヒト膀胱癌由来;ATCCセルライン・アンド・ハイブリドーマズ,第8版,1994,239頁,アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション)) を用いて、p53によるLacZ発現の抑制を検討した。前日に各種のp53+または-細胞をウェル当たり 4×10^4 細胞播種した6穴プレートに対し、「AxYp53RECre」を標記のMOIで感染させた。その翌日、「AxYCMlluc」を感染させた。その5日後に感染細胞の粗抽出液を調製し、3-1項と同様に β ガラクトシダーゼ活性を測定した。表5に相対活性で表したその結果を示す。

表 5

No	細胞	AxYCMLLZ (MOI)	AxYp53RECre (MOI)	β ガラクトシダーゼ (ratio)
1	Saos2 (p53-)	3	0	1
2		3	100	1.31
3	J82 (p53-)	3	0	1
4		3	100	0.59
5	Hs68 (p53+)	3	0	1
6		3	100	0.091
7	IMR90 (p53+)	3	0	1
8		3	100	0.006

p53欠損細胞であるSaos2、J82では「AxYp53RECre」による発現抑制はほとんど見られないが、p53発現細胞であるHs68、IMR90では、「AxYp53RECre」による顕著な発現抑制が観察された。

5) 制癌剤によるp53依存の発現抑制の増強

前日にU2OS細胞 (p53+) をウェル当たり 6×10^4 細胞播種した6穴プレートに対し、「AxYp53RECre」を標記のMOIで感染させ、その後各種化合物 (アクチノマイシン D, 塩酸ドキソルビシン、エトポシド、ノコダゾール; いずれもシグマ社、米国) を標記濃度添加した。その翌日、化合物を除去し、「AxYp53RECre」を標記のMOIで感染させた。その6日後に感染細胞の粗抽出液を調製し、3-1項と同様に β ガラクトシダーゼ活性を測定した。表6に「AxYp53RECre」感染させた場合の活性を非感染条件の活性で除した値 (残存活性と表記) に対する、各種化合物の効果を示す。

表 6

No	細胞	AxCAYLLZ (MOI)	pAxYp53RECre (MOI)	添加化合物	残存 β ガラクトシダーゼ活性 (%)
1	U2OS	10	0	なし	100
2		10	30	なし	17
3		10	0	10 ng/ml アクチノマイシンD	100
4		10	30	10 ng/ml アクチノマイシンD	2.4
5		10	0	100 ng/ml ドキソルビシン	100
6		10	30	100 ng/ml ドキソルビシン	0.5
7		10	0	1000 ng/ml エトポシド	100
8		10	30	1000 ng/ml エトポシド	0.6
9	U2OS	10	0	なし	100
10		10	10	なし	68
11		10	0	50 ng/ml ノコダゾール	100
12		10	10	50 ng/ml ノコダゾール	31

p53正常細胞では、各種の制癌剤により「AxYp53RECre」による発現抑制効果が高まることが示された。

6) p53欠損細胞に特異的な細胞死

前日にp53欠損細胞であるSaos2、およびp53発現細胞であるU2OSを播種し、ノコダゾール（シグマ社、米国）を50 ng/ml存在下で培養した。その翌日、ノコダゾールを除去し、「AxYp53RECre」を標記のMOIで感染させた。さらにその翌日、「AxCAYLTK」を標記のMOIで感染させた。その3日後に感染細胞を2000細胞/ウェルになるように96穴プレートに播種し、ウェルに種々濃度のガンシクロビル（日本ロシュ社）を添加した。その7日後に、CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay（プロメガ社、米国）にて生細胞数を測定した。図4に、「AxYp53RECre」の感染が細胞のガンシクロビル感受性に与える影響を示す。図中の「%生細胞数」とは、ガンシクロビル非添加時の細胞数を100としたときの相対値である。5サンプルの平均値を示した。誤差線はその標準偏差を示す。

p53発現細胞であるU2OSでは「AxYp53RECre」の感染によりガンシクロビル感受性が低下するが、p53欠損細胞であるSaos2ではそのような効果はない。すなわち、「AxYp53RECre」と「AxCAYLTK」とガンシクロビルの組合せにより、p53欠損細胞に特異的な細胞死が起こることが示された。

産業上の利用の可能性

本発明により、(1) 特定の転写因子の存在下で作動するプロモーターと該プロモーター支配下に存在する組換え酵素をコードする遺伝子と(2) 発現可能な任意の遺伝子と該遺伝子周辺に存在する組換え酵素の2つの標的配列(但し、該2つの標的配列の間で組換えが起こった際に、該任意の遺伝子の発現が起こらなくなるように、該任意の遺伝子と該2つの標的配列が配置されている)とを有するベクターが提供された。これにより特定の転写因子が存在しない細胞に特異的に任意の遺伝子を発現させることが可能となった。

本発明のベクターは、特に癌治療に好適に用いられる。即ち、本発明のベクターは、①組み換え酵素とその認識配列の組み合わせを用いて転写以前のステップで遺伝子発現の制御を行うため、Balmainらのシステム(Balmainら、W097/12970)のように発現強度や発現の特異性に対する問題もなく、②触媒量の組み換え酵素の発現により目的遺伝子を物理的に発現不能の状態にする遺伝子発現の不可逆的破壊システム「スイッチOFFシステム」を用いているため、上記の佐藤等の「スイッチONシステム」(佐藤ら、1997、第3回日本遺伝子治療学会講演要旨集、p49)のように、用いるプロモーターにより影響される特異性や正常細胞への毒性といった問題点も少ないことから、本発明のベクターを用いれば、広範囲の癌に対して特異的かつ安全に癌治療を行うことが可能である。

請求の範囲

1. (1) 特定の転写因子の存在下で作動するプロモーターと該プロモーター支配下に存在する組換え酵素をコードする遺伝子と (2) 発現可能な任意の遺伝子と該遺伝子周辺に存在する組換え酵素の 2 つの標的配列 (但し、該 2 つの標的配列の間で組換えが起こった際に、該任意の遺伝子の発現が起こらなくなるように、該任意の遺伝子と該 2 つの標的配列が配置されている) とを有するベクター。
2. (1) 特定の転写因子の存在下で作動するプロモーターと該プロモーター支配下に存在する組換え酵素をコードする遺伝子と (2) 発現可能な任意の遺伝子と該遺伝子周辺に存在する組換え酵素の 2 つの標的配列とが同一分子上に存在する、請求項 1 記載のベクター。
3. (1) 特定の転写因子の存在下で作動するプロモーターと該プロモーター支配下に存在する組換え酵素をコードする遺伝子と (2) 発現可能な任意の遺伝子と該遺伝子周辺に存在する組換え酵素の 2 つの標的配列とが異なる分子上に存在する、請求項 1 記載のベクター。
4. 任意の遺伝子が、組換え酵素の 2 つの標的配列に挟まれている、請求項 1 記載のベクター。
5. 任意の遺伝子を支配するプロモーターが、組換え酵素の 2 つの標的配列に挟まれている、請求項 4 記載のベクター。
6. 特定の転写因子がガン抑制遺伝子の翻訳産物である、請求項 1 記載のベクター。
7. ガン抑制遺伝子が p53 遺伝子である、請求項 6 記載のベクター。
8. 組換え酵素が Cre であり、組換え酵素の標的配列が lox である、請求項 1 記載のベクター。
9. 任意の遺伝子が自殺酵素をコードする遺伝子である、請求項 1 記載のベクター。

10. 特定の転写因子がガン抑制遺伝子の遺伝子産物であり、任意の遺伝子が自殺酵素をコードする遺伝子である、請求項1記載のベクター。

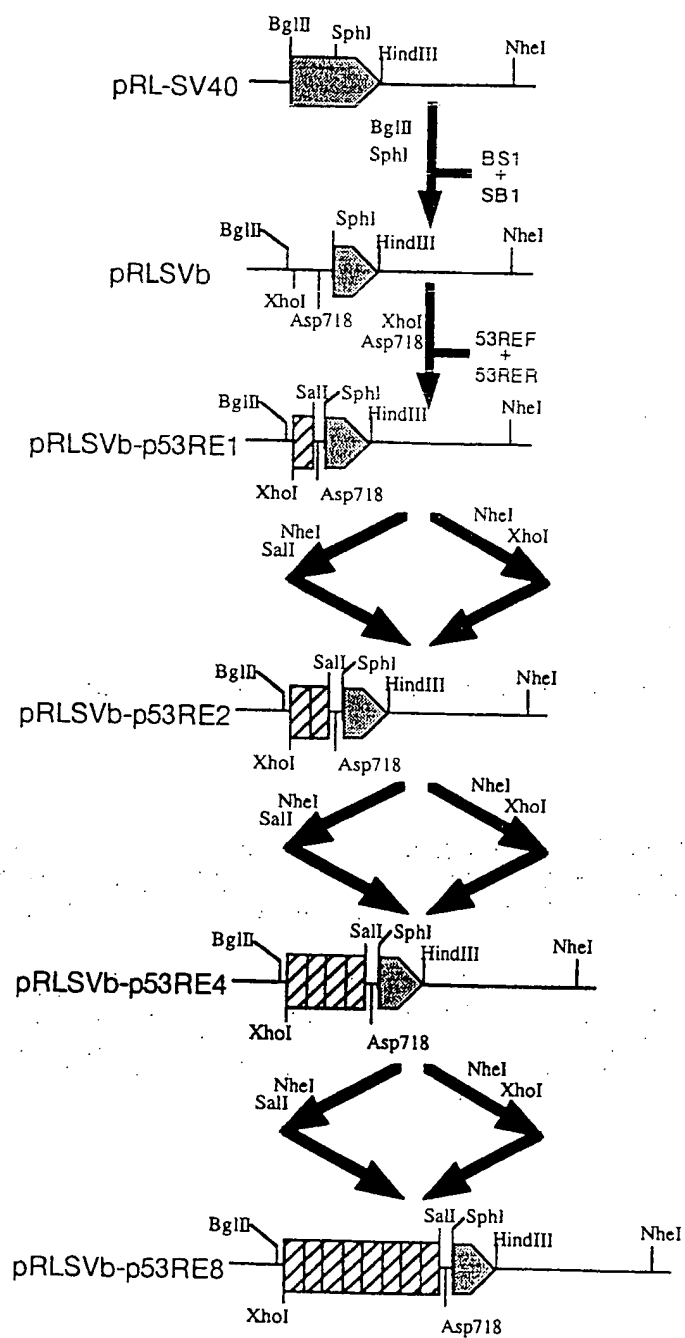
11. ガン抑制遺伝子がp53遺伝子である、請求項10記載のベクター。

12. 請求項1～11のいずれかに記載のベクターのいずれかが導入された宿主細胞。

13. 請求項1～11のいずれかに記載のベクターをインビトロで宿主細胞内に導入することを特徴とする、特定の転写因子が存在しない細胞を選択的に死滅させる方法。

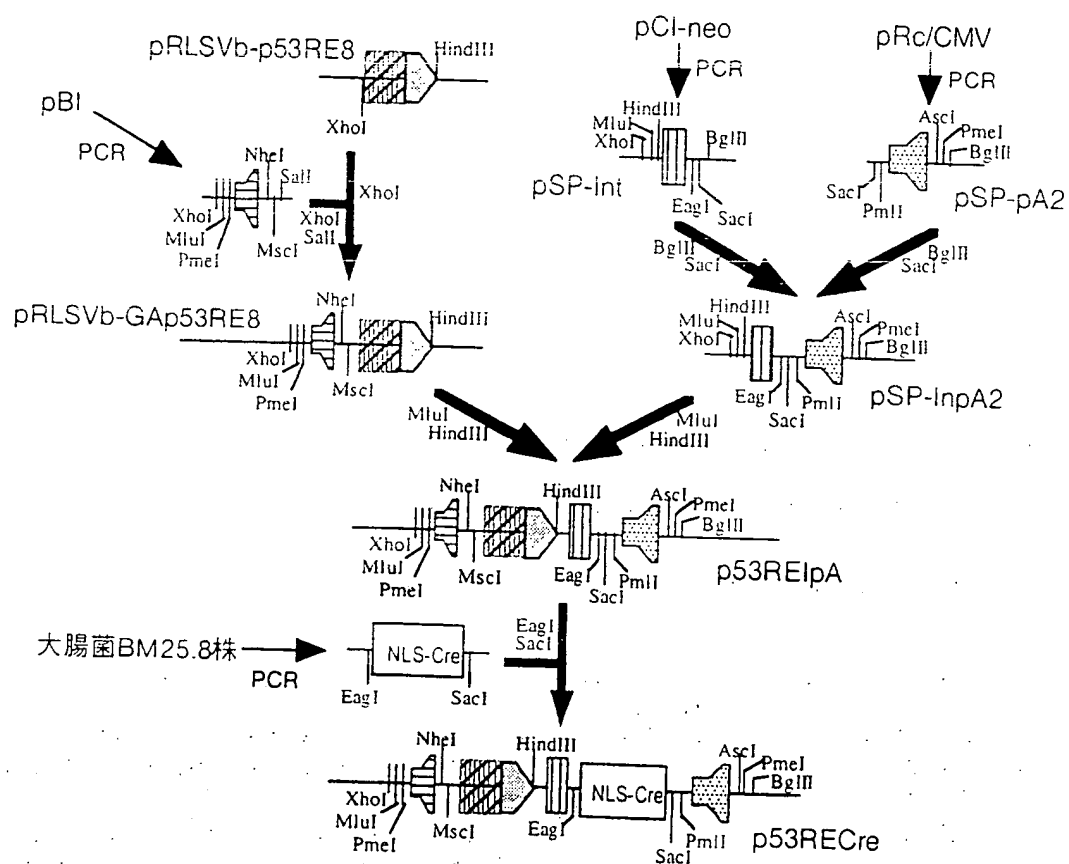
1 / 4

1



2 / 4

図 2



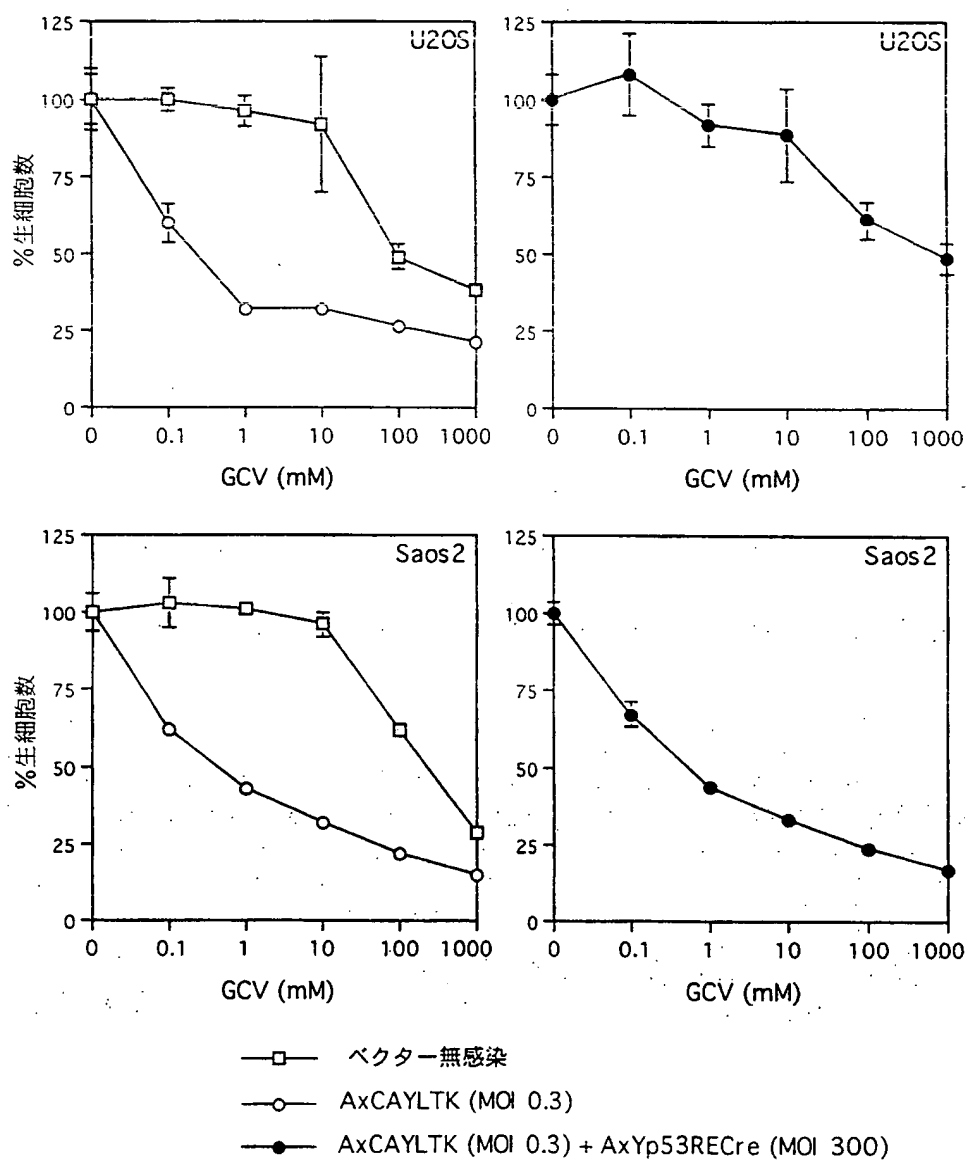
3 / 4

Figure 3 illustrates the construction of the pLoxLZIRNeo plasmid through a series of cloning steps:

- pCMVβ** is PCR-amplified and inserted into **pBS-CMV** using *Asp718*, *ScaI*, *EcoRI*, and *NotI*.
- pCMVβ** is PCR-amplified and inserted into **pBS-pA3** using *Asp718*, *NotI*, *AscI*, *ScaI*, and *SacI*.
- pBS-CMV** is digested with *EcoRI* and *NotI*, then ligated with *L1F* and *L1R* fragments to create **pBS-CMVL**.
- pBS-pA3** is digested with *Sse8387I* and *NotI*, then ligated with *L2F* and *L2R* fragments to create **pBS-LpA3**.
- pBS-CMVL** and **pBS-LpA3** are combined to form **pBS-CLLA**.
- pBS-CLLA** is digested with *SmaI* and *NotI*, then ligated with a *pCMVβ* fragment to create **pLoxLZ**.
- pCITE-2(a)** is PCR-amplified and inserted into **pBS-IRES** using *SpeI* and *BamHI*.
- pCl-neo** is PCR-amplified and inserted into **pBS-Neo** using *BamHI* and *EcoRI*.
- pBS-IRES** and **pBS-Neo** are combined to form **pBS-IRNeo**.
- pLoxLZ** and **pBS-IRNeo** are combined to form the final **pLoxLZIRNeo** plasmid.

4 / 4

図 4



1/11

配列表

- (1) 出願人氏名又は名称：株式会社ディナベック研究所
(2) 発明の名称：癌治療用ベクター
(3) 整理番号：D 3 - 9 0 6 P C T
(4) 出願番号：
(5) 出願口：
(6) 優先権のもととなった出願をした国名及び出願の番号：
日本国 平成9年特許願第223651号
(7) 優先日：1997年8月20日
(8) 配列の数：28

配列番号： 1

配列の長さ： 28

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

GATCTCTCGA GCCCGGGGGT ACCGCATG

28

配列番号： 2

配列の長さ： 20

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

CGGTACCCCC GGGCTCGAGA

20

配列番号： 3

配列の長さ： 32

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TCGAGGGACT TGCCTGGACT TGCCTGTCGA CG

32

配列番号： 4

配列の長さ： 32

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

GTACCGTCGA CAGGCAAGTC CAGGCAAGTC CC

32

配列番号： 5

配列の長さ： 46

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

3/11

配列

TCCCTCGAGA CGCGTGTTTA AACCAATGCC CTGGCTCACA AATACC

46

配列番号： 6

配列の長さ： 45

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TCCGTCGACT GGCCAGCTAG CGGCATATGT TGCCAAACTC TAAAC

45

配列番号： 7

配列の長さ： 39

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TCCCTCGAGA CGCGTAAGCT TTATTGCGGT AGTTTATCA

39

配列番号： 8

配列の長さ： 39

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

4/11

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TCCGAGCTCC GGCCGAGTAC TCTAGCCTTA AGAGCTGTA

39

配列番号： 9

配列の長さ： 36

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TCCGAGCTCC ACGTGCTGTG CCTTCTAGTT GCCAGC

36

配列番号： 10

配列の長さ： 46

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TCCAGATCTG TTAAACGGC GCGCCAAAGC CCCAAAAACA GGAAGA

46

配列番号： 11

配列の長さ： 68

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

5/11

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TGAAAGCTTC GGCCGCCACC ATGCCCAAGA AGAAGCGCAA GGTGTCCAAT TTACTGACCG 60
TACACCAA 68

配列番号： 12

配列の長さ： 33

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TCCGAGCTCC TAATCGCCAT CTTCCAGCAG GCG 33

配列番号： 13

配列の長さ： 37

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

AGCTTCTAGA CAGCCAGACT GCCTCCGGG TCACTGC 37

配列番号： 14

配列の長さ： 27

6/11

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

GTTCTAGACC CCATGTAATA AAAGGTG

27

配列番号： 15

配列の長さ： 55

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TCAGGTACCG GCGCGCCAGT ACTGGCCGGC CCGTTACATA ACTTACGGTA AATGG

55

配列番号： 16

配列の長さ： 33

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TCCGAATTCG TACAATTCCG CAGCTTTTAG AGC

33

配列番号： 17

7/11

配列の長さ： 41

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TTGCCGCGGC CTGCAGGCAG ACATGATAAG ATACATTGAT G

41

配列番号： 18

配列の長さ： 47

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TCCGAGCTCA GTACTGGCGC GCCAAAAAAC CTCCCACACC TCCCCCT

47

配列番号： 19

配列の長さ： 47

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

AATTCATAAC TTCGTATAGC ATACATTATA CGAAGTTATC CCGGGGC

47

8/11

配列番号： 20

配列の長さ： 47

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

GGCCGCCCCG GGATAACTTC GTATAATGTA TGCTATACGA AGTTATG

47

配列番号： 21

配列の長さ： 58

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

GGCCGCGTCG ACATAACTTC GTATAGCATA CATTATACGA AGTTATACTA GTCCTGCA

58

配列番号： 22

配列の長さ： 50

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

GGACTAGTAT AACTTCGTAT AATGTATGCT ATACGAAGTT ATGTCGACGC

50

9/11

配列番号： 23

配列の長さ： 35

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TCCACTAGTT CATGATTGAA CAAGATGGAT TGCAC

35

配列番号： 24

配列の長さ： 48

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TTCCGAATTC CCTGCAGGGG ATCCTCAGAA GAACTCGTCA AGAAGGCG

48

配列番号： 25

配列の長さ： 33

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

10/11

TCCACTAGTG TTATTTTCCA CCATATTGCC GTC

33

配列番号： 26

配列の長さ： 33

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TCAGGATCCC CATGGCCATG GTATTATCAT CGT

33

配列番号： 27

配列の長さ： 39

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

配列

TGAGCCCGGG CCGCCACCAT GGCTTCGTAC CCCTGCCAT

39

配列番号： 28

配列の長さ： 39

配列の型： 核酸

鎖の数： 1本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の特徴： 他の核酸 合成DNA

WO 99/09191

PCT/JP98/02993

11/11

配列

TCCTACTAGT GCGGCCGCTC AGTTAGCCTC CCCCATCTC

39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/02993

<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl⁶ C12N15/85, C12N5/10, A61K48/00</p>												
<p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>												
<p>B. FIELDS SEARCHED</p>												
<p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl⁶ C12N15/85, C12N5/10, A61K48/00</p>												
<p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p>												
<p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), Genbank/EMBL/DDBJ/Geneseq</p>												
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p>												
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
A	WO, 97/12970, A1 (CANCER RESEARCH CAMPAIGN TECHNOLOGY LIMITED), 10 April, 1997 (10. 04. 97) & GB, 2305920, A & AU, 9671386, A	1-13										
A	Nigeti, J. et al., "Site-specific recombinases: tools for genome engineering" Trends Genet. (1993) Vol. 9, No. 12 p.413-421	1-13										
A	Ta-Jen, L. et al., "Apoptosis Induction Mediated by Wild-Type p53 Adenoviral Gene Transfer in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck" Cancer Res. (1995) Vol. 55, No. 14 p.3117-3122.	1-13										
<p><input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.</p>												
<p>* Special categories of cited documents:</p> <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier document but published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
<p>Date of the actual completion of the international search 14 September, 1998 (14. 09. 98)</p>		<p>Date of mailing of the international search report 29 September, 1998 (29. 09. 98)</p>										
<p>Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office</p>		<p>Authorized officer</p>										
<p>Facsimile No.</p>		<p>Telephone No.</p>										

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP98/02993

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/85, C12N5/10, A61K48/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/85, C12N5/10, A61K48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), Genbank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 97/12970, A1 (CANCER RESEARCH CAMPAIGN TECHNOLOGY LIMITED) 10. 4月. 1997 (10. 04. 97) & GB, 2305920, A & AU, 9671386, A	1-13
A	Nigei, J. et al. "Site-specific recombinases: tools for genome engineering" Trends Genet. (1993) 第9巻 第12号 p. 413-421	1-13
A	Ta-Jen, L. et al. "Apoptosis Induction Mediated by Wild-Type p53 Adenoviral Gene Transfer in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck" Cancer Res. (1995) 第55巻 第14号 p. 3117-3122	1-13

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 09. 98

国際調査報告の発送日

29.09.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富士 良宏

印

4 B

9 5 4 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3449